

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKEISHI, Yasuhiko
 Minori Patent Agency
 Chiyoda Seimei Kyoto Oike
 Building, 8th Floor
 200, Takamiya-cho, Oike-
 dori Takakura Nishi-iru
 Nakagyo-ku, Kyoto-shi
 Kyoto 604-0835
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 15 February 2000 (15.02.00)	
Applicant's or agent's file reference Mitsubishi-1	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/00521	International filing date (day/month/year) 08 February 1999 (08.02.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address TAKEISHI, Yasuhiko 330-1, Maruya-cho, Gokomachidori- Sanjo Agaru Nakagyo-ku Kyoto-shi, Kyoto 604-8086 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 075-241-0880	
	Facsimile No. 075-255-2677	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address TAKEISHI, Yasuhiko Minori Patent Agency Chiyoda Seimei Kyoto Oike Building, 8th Floor 200, Takamiya-cho, Oike- dori Takakura Nishi-iru Nakagyo-ku, Kyoto-shi Kyoto 604-0835 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No. 075-241-0880	
	Facsimile No. 075-255-2677	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	99PF189-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/05221	国際出願日 (日.月.年)	24.09.99	優先日 (日.月.年)
		19.11.98	
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Jun, U. et al. "The Synergistic Effects of Two-Intron Insertions on Heterologous Gene Expression and Advantages of the First Intron of a Rice gene for Phospholipase D" Plant Cell Physiol. (1999) 第40巻 第6号 p. 618-623	1-20
Y	WO, 96/30510, A1 (日本たばこ産業株式会社) 3.10月.1996 (03.10.96) & AU, 9651207, A & EP, 769553, A1 & JP, 8-529172, A & US, 5801019, A	1-20
Y	Maureen, C. et al. "Maize Shrunk-1 intron and exon regions increase gene expression in maize protoplasts" Plant Science (1994) 第98巻 第2号 p. 151-161	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.12.99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ichiro, M. et al. "Efficient Promoter Cassetts for Enhanced of Foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants" Plant Cell Physiol. (1996) 第37巻 第1号 p. 49-59	1-20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, 15/82, A01H 1/06	A1	(11) 国際公開番号 WO00/31250 (43) 国際公開日 2000年6月2日 (02.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05221 (22) 国際出願日 1999年9月24日 (24.09.99) (30) 優先権データ 特願平10/329832 1998年11月19日 (19.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)[JP/JP] 〒105-8422 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 植木 潤(UEKI, Jun)[JP/JP] 〒438-0802 静岡県磐田郡豊田町東原700番地 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Sizuoka, (JP) (74) 代理人 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NUCLEIC ACID FRAGMENTS, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING THE SAME AND METHOD FOR PROMOTING THE EXPRESSION OF STRUCTURAL GENE BY USING THE SAME

(54) 発明の名称 核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

(57) Abstract

Novel nucleic acid fragments having an excellent effect of promoting the expression of a structural gene located downstream thereof. These nucleic acid fragments involve an isolated nucleic acid fragment having the base sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing and isolated nucleic acid fragments derived therefrom by substitution, deletion, insertion or addition of one or more bases in the above-described base sequence and having an effect of promoting the expression of a structural gene located downstream thereof (but excluding a nucleic acid having the base sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing).

下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が優れた新規な核酸断片が開示されている。本発明の核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する単離された核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する単離された核酸断片(ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く)である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CJ	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現促進方法

技術分野

- 5 本発明は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する機能を有する核酸断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた構造遺伝子の発現方法に関する。

背景技術

- 10 外来遺伝子の発現促進は、遺伝子工学の手法を植物に応用する際に最も必要とされる技術である。その技術のひとつに遺伝子発現の促進効果を有するDNA断片の利用がある。外来遺伝子の発現を促進するDNA断片としては、トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼのイントロン (Callis et al. Gene & Development 1, 1183-1200 (1987)) 及びイネのホスホリパーゼD (以下、「PLD」ということがある) の第1イントロン (国際公開公報W096/30510) 等が知られている。
- 15 また、イントロン由来のDNA断片について、イントロンの内部配列を一部削除したり、あるいはイントロンの内部に同一のイントロンを挿入して発現促進作用へ及ぼす影響を調べた事例が報告されている (Mascarenhas et al. Plant Mol. Biol. 15, 913-920 (1990), Clancy et al. Plant Sci. 98, 151-161 (1994)) 。

- 20 しかしながら、現状では利用できるDNA断片の種類が限られており、発現促進効果も不十分である場合が多いため、より効果の大きいDNA断片の存在が望まれていた。また、上記のように、イントロン配列を修飾することにより発現促進効果を高める試みが行なわれているが、イントロン内部の発現促進作用を有する領域を特定した事例や、促進作用がもとのイントロン由来DNA断片の2倍に達した事例は知られていない。

発明の開示

- 25 従って、本発明の目的は、下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果が優れた新規な核酸断片、該核酸断片を含み、構造遺伝子の発現が促進された組換えベクター及び該核酸を用いてその下流の構造遺伝子の発現を促進する方法を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、イネのホスホリパーゼD（以下、「PLD」、
ということがある）の第1イントロン中の特定の領域が、優れた遺伝子発現促進
効果を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する単離された
5 核酸断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又
は該塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片で
あって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する単離され
た核酸断片（ただし、配列表の配列番号3記載の塩基配列を有する核酸を除く）
を提供する。また、本発明は、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸
10 断片又は該塩基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該
塩基配列に1若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であっ
て、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片（た
だし、配列表の配列番号3記載の塩基配列を有する核酸を除く）と、該核酸断片
15 の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造
遺伝子の発現が促進される組換えベクターを提供する。さらに、本発明は、構造
遺伝子上流に、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩
基配列のうち1若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に1
若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流
20 に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片（ただし、配列表
の配列番号3記載の塩基配列を有する核酸を除く）を挿入することから成る、構
造遺伝子の発現促進方法を提供する。さらに、本発明は、該本発明の方法により、
所望の構造遺伝子の発現が促進された植物及び該形質を維持するその子孫を提供
する。

本発明により、構造遺伝子上流に組み込むことにより、該構造遺伝子の発現
25 が有意に促進される新規な核酸断片が提供された。本発明の核酸断片を構造遺
伝子上流に挿入することにより、該構造遺伝子の発現が促進されるので、本発
明は、例えば組換えベクターを用いた外来遺伝子の発現を促進することができ、遺
伝子工学の分野などにおいて多いに貢献するものと期待される。

発明を実施するための最良の形態

上記のように、本発明の核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片である。ただし、配列表の配列番号 3 に示される塩基配列は、イネの PLD の第 1 イントロンの塩基配列であり、イネの PLD の第 1 イントロンがその下流の遺伝子の発現促進効果を有することは、既に本出願人が明らかにしている（国際公開公報 W096/30510）ので、この配列は除外する。なお、配列番号 1 に示す塩基配列は、イネの PLD の第 1 イントロン（配列番号 3）の 5' 末端から第 2 番目の塩基（以下、「2 nt」のように記載）から 65 nt の領域の塩基配列である。

上記の通り、配列番号 1 に示す塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片（以下、便宜的に「修飾核酸断片」ということがある）も本発明の範囲に含まれる。この場合、修飾核酸断片中の、配列番号 1 記載の配列に対応する部分は、配列番号 1 記載の配列と 70% 以上、さらに好ましくは 85% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の相同性を有していることが好ましい。また、これらの修飾核酸は、配列番号 1 で示される塩基配列を有する核酸と、ストリンジェントな条件（すなわち、5 x Denhardt's reagent, 6 x SSC, 0.5% SDS 又は 0.1% SDS といった一般的なハイブリダイゼーション溶液を用いて 50~65℃ で、好ましくは 50℃ と 60℃ の 2 段階、又は、50℃、55℃、60℃、65℃ の 4 段階で反応を行なう）において、ハイブリダイズするものであることが好ましい。

さらに、本発明の核酸を、発現を促進したい構造遺伝子上流に挿入する場合、遺伝子の発現促進に効果のある、できるだけ小さな領域を挿入することが好ましいので、本発明の核酸の塩基数は 120 塩基以下であることが好ましく、さらに好ましくは 80 塩基以下であり、さらに好ましくは 64 塩基以下である。

上記本発明の核酸断片は、2 個以上連結することによりその効果をより大きく

することが可能である。この場合、本発明の核酸断片を直接連結してもよいし、それらの間に他の配列が介在していてもよい。

本発明の核酸はDNAでもRNAでもよいが、安定性の観点からDNAが好ましい。

5 本発明の核酸断片は、化学合成により容易に調製することができる。また、イネPLD遺伝子の第1イントロンの配列は既に公知であるので（国際公開公報W 096/30510）、イネのゲノミックDNAを鋳型としたPCR等の核酸増幅法により容易に調製することができる。PCRはこの分野において周知であり、そのためのキット及び装置も市販されているので容易に実施することができる。

10 なお、本発明の核酸断片を複数連結する場合には、複数の本発明の核酸断片を予め連結してもよいし、本発明の核酸断片を含む領域に本発明の核酸断片を挿入してもよい。

15 構造遺伝子上流に上記した本発明の核酸断片を挿入することにより、該構造遺伝子の発現を促進することができる。構造遺伝子は、その上流に位置するプロモーターにより制御されるが、本発明の核酸断片は、プロモーターと構造遺伝子の間に挿入してもよいし、プロモーターの上流に挿入してもよいが、前者がより好ましい。この場合、本発明の核酸断片と構造遺伝子の距離は0bp～1000bpが好ましく、また、プロモーターと本発明の核酸断片との距離も0bp～1000bpが好ましい。

20 本発明の核酸断片は、発現を促進しようとする構造遺伝子上流に位置するイントロン配列中に挿入することが好ましい。このようなイントロン配列は特に限定されないが、好ましい例としてイネのPLD遺伝子の第1イントロン（配列番号3）を挙げることができる。イントロン配列中に挿入する場合、本発明の核酸断片の挿入位置は特に限定されない。プライマーの一部がイントロン断片と共に
25 挿入されていてもよい。もっとも、イントロンがイネのPLD遺伝子の第1イントロン（配列番号3）である場合には、本発明の核酸断片が複数連結されるように、イントロンの1又は65ntに挿入することが好ましく、特に65ntに挿入して本発明の核酸断片を2個直結することが好ましい。なお、発現を促進しようと

する構造遺伝子上流にイントロン配列が必ずしも存在するとは限らないが、適当なイントロン配列が存在しない場合には、先ず、発現を促進しようとする構造遺伝子上流に例えばイネPLD遺伝子の第1イントロンのような適当なイントロン配列を挿入し、これに本発明の核酸断片を挿入することができる。なお、挿入は、制限酵素を用いた常法により容易に行うことができる。

本発明はまた、上記本発明の方法を発現ベクターに適用して得られる組換えベクターを提供する。本発明の組換えベクターは、市販の発現ベクターのクローニング部位に本発明の核酸断片と、発現を促進すべき構造遺伝子とを挿入することにより容易に調製することができる。なお、このような発現ベクターは、植物用発現ベクターが好ましく、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与えるクローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定に終了させるターミネーターを含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、下記実施例は例示のためにのみ記載するものであり、下記実施例をいかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

35S プロモーターの下流に beta-Glucuronidase (GUS) 遺伝子を配した CLONTECH 社製のベクター pBI221 (35S promoter, GUS) に、下記のように、分割した PLD イントロンの内部領域、PLD イントロン、さらに一部の領域を重複させた PLD イントロンを挿入して GUS 発現の促進効果を調べた。

ベクターを以下の方法で作製した。イネの PLD 遺伝子の第1イントロンは173塩基からなる(配列番号3)。イントロンの2nt~65nt、66nt~120nt、121nt~173ntの領域に対応するDNA断片をPCRによって得た。用いたプライマーは、それぞれ

5'-CTATGACCCGGGATCCTAAGCCAGTGTGC-3' と

5' -GCAAGCAAGCAGATCTGAGCGGAGAAGAAG-3'、
 5' -TATGACCCGGGATCCGATCTGCTTGCTTGC-3' と
 5' -ACCTAACGTAGATCTAGCGACACTCGCAGC-3'、
 5' -TATGACCCGGGATCCGCTTCGTCTTCCTTC-3' と
 5' -GTGTCGCTAGATCTCTGCGCCCCCCCACAC-3'

である。PCR 産物を制限酵素 BamHI および BglII で消化して、pBI221 のマルチクローニング部位にある BamHI サイトに挿入した (pBI [PLD(2-65)]、pBI [PLD(66-120)]、および pBI [PLD(121-173)])。

さらに、次のように 2 nt ~ 65 nt あるいは 66 nt ~ 120 nt の領域を重複して含む PLD イントロンを有するベクターを作製した。まず、W096/30510 に記載されるように、イネ PLD 遺伝子の第 1 イントロン (配列番号 3) をプライマー (5' -ACCCGGTAAGCCCAG-3'、3' -CCCCGCGTCCATCC-5') を用いて PCR により増幅し、該増幅産物を pCRII ベクターにサブクローニングし、EcoRI で切り出して Klenow 断片によって平滑末端とした後、pBI221 ベクターの SmaI 部位に挿入した pBI221 ベクター (pBI [PLD]) を調製した。該イントロン配列を BglII によってイントロンの 65 番目の部位で切断し、BamHI および BglII で消化した上記の PCR 産物を挿入した (pBI [PLD+PLD(2-65)] および pBI [PLD+PLD(66-120)])。

既報 (Shimamoto et al. Nature, 338, 274-276 (1989)) の方法にしたがってイネ培養細胞 (Baba et al. Plant Cell Physiol. 27, 463-471 (1986)) に上記組換えプラスミドを導入後、 β -glucuronidase (GUS) 活性を測定した。活性の相対値を表 1 に示す。

表 1

ベクター	相対 G U S 活性
pBI221	1.0
pBI [PLD]	14
pBI [PLD(2-65)]	4.9
pBI [PLD(66-120)]	2.5
pBI [PLD(121-173)]	1.7
pBI [PLD+PLD(2-65)]	28
pBI [PLD+PLD(66-120)]	14

PLD イントロンの分割では、3 つの領域とも対照 (pBI221) に比べて高い GUS

活性を示した。2 n t ~ 6 5 n t の領域の効果が最も高く、次が6 6 n t ~ 1 2 0 n t の領域であった。これら2つの領域をイントロン内に挿入した場合は、2 n t ~ 6 5 n t の領域の重複で、活性がもとのイントロンの場合の2倍になった。しかし、6 6 n t ~ 1 2 0 n t の領域の重複では活性の上昇は認められなかった。

- 5 以上の結果から、PLD イントロンの2 n t ~ 6 5 n t の領域は、遺伝子発現を促進する効果を有することが明らかになった。2 n t ~ 6 5 n t の領域の塩基配列を配列番号1に、また2 n t ~ 6 5 n t の領域を重複させたイントロン（両端にエクソン配列10塩基ずつを含む）の塩基配列を配列番号4に、両端のエクソン配列を除いたイントロン部分の配列を配列番号2に示す。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する単離された核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流
5 に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する単離された核酸断片(ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く)。
2. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする請求項 1 記載の核酸断片。
3. 塩基数が 120 以下である請求項 1 又は 2 記載の核酸断片。
- 10 4. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する請求項 1 記載の核酸断片。
5. 請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の核酸断片が複数連結された核酸断片。
6. 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複
15 数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片(ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く)と、該核酸断片の下流に位置する構造遺伝子とを少なくとも含み、前記核酸断片により、該構造遺伝子の発現が促進される組換えベクター。
- 20 7. 前記核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする請求項 6 記載の組換えベクター。
8. 前記核酸断片は、塩基数が 120 以下である請求項 6 又は 7 記載の組換えベクター。
9. 前記核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する請求項 8 記載の組換えベクター。
25
10. 前記核酸断片は、前記構造遺伝子上流に位置するイントロン配列中に挿入されている請求項 6 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の組換えベクター。
11. 前記イントロン配列は、配列表の配列番号 3 で示される塩基配列を有す

る請求項 10 記載の組換えベクター。

12. 前記イントロン配列は、配列表の配列番号 2 に示される塩基配列を有する核酸を含む請求項 10 記載の組換えベクター。

13. 構造遺伝子の上流に、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸断片又は該塩基配列のうち 1 若しくは複数の塩基が置換し若しくは欠失し又は該塩基配列に 1 若しくは複数の塩基が挿入され若しくは付加された核酸断片であって、その下流に位置する構造遺伝子の発現を促進する効果を有する核酸断片（ただし、配列表の配列番号 3 記載の塩基配列を有する核酸を除く）を挿入することから成る、構造遺伝子の発現促進方法。

14. 前記核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする請求項 13 記載の方法。

15. 前記核酸断片は、塩基数が 120 以下である請求項 13 又は 14 記載の方法。

16. 前記核酸断片は、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する請求項 15 記載の方法。

17. 前記核酸断片を、前記プロモーターの上流に位置するイントロン配列中に挿入する請求項 13 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

18. 前記イントロン配列は、配列表の配列番号 3 に示す塩基配列を有する請求項 17 記載の方法。

19. 前記核酸断片を挿入することにより、該核酸断片が複数連結された領域が形成される請求項 13 ないし 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

20. 請求項 13 ないし 19 のいずれか 1 項に記載された方法により、所望の構造遺伝子の発現が促進された植物及び該形質を維持するその子孫。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> Nucleic acid fragments, recombinant vectors containing the same and method for promoting expression of structural genes using the same

<130> 99PF189-PCT

<160> 12

<210> 1

<211> 64

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

taagcccagt gtgcttaggc taagcgcaact agagcttctt gctcgcttgc ttctttctccg 60

ctca 64

<210> 2

<211> 242

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 2

gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgcaact tagagcttct tgctcgcttg ctctttctcc 60

gctcagatcc taagcccagt gtgcttaggc taagcgcaact agagcttctt gctcgcttgc 120

ttctttctccg ctcagatctg cttgcttgct tgcttcgcta gaaccctact ctgtgctgcg 180

agtgtcgctg cttcgtcttc cttcctcaag ttcgatctga ttgtgtgtgt gggggggcgc 240

ag 242

<210> 3

<211> 173

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/4

<213> Oryza sativa

<400> 3

gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgac tagagcttct tgctcgcttg cttcttctcc 60
gctcagatct gcttgcttgc ttgcttcgct agaaccctac tctgtgctgc gagtgtcgt 120
gcttcgtctt ccttcctcaa gttcgatctg attgtgtgtg tgggggggcg cag 173

<210> 4

<211> 262

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 4

tcaccaccg gtaagcccag tgtgcttagg ctaagcgac tagagcttct tgctcgcttg 60
cttcttctcc gctcagatcc taagcccagt gtgcttaggc taagcgact agagcttctt 120
gctcgcttgc ttcttctcgg ctcagatctg cttgcttgct tgcttcgcta gaaccctact 180
ctgtgctgcg agtgtcgtg cttcgtcttc cttcctcaag ttcgatctga ttgtgtgtgt 240
ggggggggcg aggtagggcg ag 262

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 5

CTATGACCCG GGATCCTAAG CCCAGTGTGC

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/4

gcaagcaagc agatctgagc ggagaagaag

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 7

tatgaccgg gatccgatct gcttgcttgc

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 8

acctaacgta gatctagcga cactcgcagc

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 9

tatgaccgg gatccgcttc gtcttccttc

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 10

gtgtcgctag atctctgcgc cccccacac

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/4

<210> 11

<211> 15

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 11

accggttaag cccag

15

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 12

ccccgcgctc catcc

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05221

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG) ,
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Jun,U.et al, "The Synergistic Effects of Two-Intron Insertions on Heterologous Gene Expression and Advantages of the First Intron of a Rice gene for Phospholipase D" Plant Cell Physiol. (1999), Vol. 40, No. 6, p.618-623	1-20
Y	WO, 96/30510, A1 (JAPAN TOBACCO INC.), 03 October, 1996 (03.10.96) & AU, 9651207, A & EP, 769553, A1 & JP, 8-529172, A & US, 5801019, A	1-20
Y	Maureen,C.et al., "Maize Shrunken-1 intron and exon regions increase gene expression in maize protoplasts" Plant Science (1994), Vol. 98, No. 2, p.151-161	1-20
A	Ichiro,M.et al."Efficient Promoter Cassetts for Enhanced of Foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants" Plant Cell Physiol. (1996), Vol. 37, No. 1, p.49-59	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
09 December, 1999 (09.12.99)

Date of mailing of the international search report
21 December, 1999 (21.12.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05221

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/82, A01H1/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Jun, U. et al. "The Synergistic Effects of Two-Intron Insertions on Heterologous Gene Expression and Advantages of the First Intron of a Rice gene for Phospholipase D" Plant Cell Physiol. (1999) 第40巻 第6号 p. 618-623	1-20
Y	WO, 96/30510, A1 (日本たばこ産業株式会社) 3. 10月. 1996 (03. 10. 96) & AU, 9651207, A & EP, 769553, A1 & JP, 8-529172, A & US, 5801019, A	1-20
Y	Maureen, C. et al. "Maize Shrunk-1 intron and exon regions in crease gene expression in maize protoplasts" Plant Science (1994) 第98巻 第2号 p. 151-161	1-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09. 12. 99

国際調査報告の発送日

21.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

印

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ichiro, M. et al. "Efficient Promoter Cassetts for Enhanced of Foreign Genes in Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants" Plant Cell Physiol. (1996) 第37巻 第1号 p. 49-59	1-20